

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 58 989.5

Anmeldetag: 13. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Carl Zeiss Jena GmbH, Jena/DE

Bezeichnung: Testpräparat für Mikroskope

IPC: G 02 B, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Schmidt C.

Testpräparat für Mikroskope

Gegenstand der Erfindung ist ein Testpräparat für Mikroskope, welches Fluoreszenzeigenschaften aufweist und zum Nachweis der Funktion und/oder

5 Leistungsfähigkeit der Mikroskope dienen kann.

Als Fluoreszenztestpräparate werden in der Mikroskopie bisher Präparate eingesetzt, die entweder eine gewisse Eigenfluoreszenz zeigen oder einer speziellen Behandlung mit Farbstoffen unterzogen werden..

10 Bekannt sind zum einen künstliche Präparate (z.B. sphärische Kunststoffkörper in Größen vom Nanometer- bis in den Mikrometerbereich), die durch Beimischung von Farbstoffmolekülen bei der Herstellung im Wesentlichen die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs übernehmen. Solche sogenannten Microspheres oder Microbeads sind z. B. bekannt aus US 4,336,173, US 4,247,434, US 4,714,682, US 4,868,126 und anderen.

15 Weiterhin bekannt sind Testpräparate aus biologischem Gewebe, das durch Anfärben entweder mit natürlichem Licht sichtbar wird, bzw. durch Beobachtung der Fluoreszenzemission des Färbemittels mit einem Mikroskop mit angepassten optischen Filtern. Ausserdem werden Präparate eingesetzt, bei denen spezielle funktionelle Gruppen von Molekülen oder gar Geweben gezielt fluoreszenzmarkiert werden, indem jene eingebrachten Farbstoffmoleküle durch chemische Bindung spezifisch an die funktionellen Gruppen fixiert
20 werden und eine Identifikation dieser ermöglichen. Solche Testpräparate werden z. B. von der Firma Molecular Probes, Eugene, OR, USA unter dem Namen FluoCells hergestellt und vertrieben.

Schließlich existieren in der Natur auch Gewebearten mit einer gewissen Eigenfluoreszenz. Ein Vertreter davon ist das Maiglöckchen (*Convallaria majalis*), dessen Stängelquerschnitte zur Herstellung von Testpräparaten für Laser Scanning Mikroskope dienen, da sie eine ausgeprägte 3-dimensionale Wabenstruktur zeigen.

Alle genannten Arten der Fluoreszenzpräparation haben eine Reihe von Nachteilen:

30 Zunächst ist die Herstellung unter Verwendung spezieller Färbemittel aufwendig. Gerade die Markierung durch spezifische chemische Bindung verlangt ein hohes Maß an Wissen über die zu markierende Probe selbst. Nicht alle Proben können mit allen Farbstoffen auf diese Weise markiert werden. So benötigen Zellkerne andere Farbstoffe als z.B. Actine. Gegebenenfalls müssen zur Herstellung des Endpräparats mehrere Schritte der chemischen Synthese erfolgen. Der Hauptnachteil ist jedoch, dass die Fluoreszenzanregung und -Emission der Präparate durch die entsprechenden Eigenschaften der verwendeten Farbstoffmoleküle gegeben ist, d.h.

es existiert pro Farbstoffsorte nur ein schmaler spektraler Bereich, in dem die Probe durch Licht angeregt werden kann, und zudem nur ein begrenzter spektraler Bereich, in dem die Fluoreszenzemission erfolgt. Diese Bereiche liegen üblicherweise in der Größenordnung von einigen 10 Nanometern auf der Wellenlängenskala. Auch bei Vorliegen von Eigenfluoreszenz sind diese Spektralbereiche sehr begrenzt und abhängig von dem zugrunde liegenden Gewebe oder Zellverband. Somit können nur bestimmte optische Filter eingesetzt werden, um die Probe abzubilden. Zum Test verschiedener Filtersätze sind daher auch verschiedene Präparate notwendig.

- 10 Die Aufgabe der Erfindung liegt in der Überwindung der Nachteile des Standes der Technik und der Angabe eines vielseitig einsetzbaren Testpräparates.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Merkmale des 1. Anspruchs gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den abhängigen Ansprüchen aufgeführt.

- 15 Überraschend hat sich gezeigt, dass mit Glutardialdehyd (Pentandialdehyd) auf dem Objektträger fixierte Zellverbände ein sehr breites Fluoreszenzspektrum aufweisen. Die Anregung und Emission der Fluoreszenz kann über den gesamten spektralen Bereich vom nahen Ultraviolett (ca. 350 nm) bis über den sichtbaren Bereich erfolgen (ca. 700 nm). Somit kann jede beliebige Kombination von Filtersätzen herangezogen werden, um eine Abbildung dieses Präparats zu gewährleisten.

Das erfindungsgemäße Präparat kann vorteilhaft in der Fluoreszenzmikroskopie zur Kalibration der optischen Verfahren, wie zum Beispiel konfokale Mikroskopie, Weitfeld-Epifluoreszenz und Verfahren der strukturierten Beleuchtung angewendet werden. Es hat sich gezeigt, dass das erfinderische Präparat zudem nur eine geringe Neigung zum Ausbleichen zeigt.

- Die Erfindung wird im Folgenden an Hand eines bevorzugten Ausführungsbeispiels erläutert. Das Präparat selbst besteht aus tierischem oder menschlichem Gewebe. Die Zell- und Gewebestruktur wird mit Glutardialdehyd fixiert. Die Konzentration des Glutardialdehyd sowie die Fixierzeit ist abhängig von Gewebe bzw. Zelltyp. Typische Werte liegen bei 2 bis 30 5% Glutardialdehyd in PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) mit einer Einwirkzeit von 30min. Durch die Fixierung werden die Proteine im Gewebe durch eine chemische Reaktion mit dem Glutardialdehyd denaturiert und somit wird der Strukturzusammenhang der Probe gesichert. Das überschüssige Glutardialdehyd wird anschließend durch mehrere Waschschr

aus dem Gewebe entfernt. Um von dem Gewebe Schnitte zur mikroskopischen Beobachtung anfertigen zu können wird das Gewebe weiter aufgearbeitet. Es kann z.B. schockgefroren werden oder sukzessive in Parafin eingebettet werden. Es entsteht ein Gewebeblock, der mit einer geeigneten Schneidevorrichtung (z.B. Mikrotom) geschnitten werden kann. Die Dicke des Schnittes ist nicht festgelegt - typische Schnittdicken liegen bei 2 bis 20 µm. Für einige Anwendungen, wie etwa der strukturierten Beleuchtung, eignet sich besonders ein eher dünner Schnitt mit einer Dicke <10 µm.

Die Schnitte werden auf einen Glas Objektträger vorzugsweise mit Standardabmessungen (z.B. 26mm * 76 mm) aufgebracht. Die Haftfähigkeit der Schnitte auf dem Objektträger kann durch Beschichtung des Objektträgers z.B. durch Poly-D-Lysin erhöht werden.

Eine auf diese Weise hergestellte Probe weist die im Ergebnis der Erfindung gefundenen breiten spektralen Fluoreszenzeigenschaften auf. Es bietet sich an, zu dem Einbettmedium ein sogenanntes „Antifade“-Reagenz zuzugeben, das ein übermäßiges Fluoreszenzbleichen verhindert. Diese Reagenzien arbeiten in der Regel über die Bindung freier Sauerstoffradikale, die folglich die chromophoren Gruppen der vorliegenden Moleküle nicht zerstören können. Ein Beispiel dafür wird von der Firma Molecular Probes unter der Bezeichnung ProLong hergestellt und vertrieben.

Mit einem Deckglas, vorzugsweise mit Standarddicke (0,17 mm), wird das Präparat gegen Umwelteinflüsse abgeschirmt und dauerhaft haltbar gemacht. Zudem ist es so der

Beobachtung mit Standardobjektiven mit Deckglaskorrektur zugänglich.

Für einige Anwendungen (z.B. das Verfahren der strukturierten Beleuchtung) ist es vorteilhaft dichte Gewebestrukturen zu verwenden, um eine Abbildung über das gesamte Sehfeld des optischen Instrumentes zu ermöglichen und zugleich ein möglichst lückenloses Bild zu sichern. Bei anderen Anwendungen (z.B. konfokale Mikroskopie) bietet es sich an, eher feine Strukturen zu verwenden, um spezifische Leistungsmerkmale des Verfahrens dokumentieren zu können.

Es kann vorteilhaft sein, eine Klarlackversiegelung des Präparats am Deckglasrand vorzunehmen.

Die Erfindung ist nicht an das beschriebene Ausführungsbeispiel gebunden, so können auch andere chemische Verbindungen mit genügend breiter spektraler Fluoreszenzanregung zur Fixierung benutzt werden.

Patentansprüche

1. Testpräparat für Mikroskope, insbesondere optische Mikroskope, bestehend aus einem Objektträger und einem auf diesem aufgetragenen biologischen Zellverband, wobei der Zellverband mit einer Verbindung fixiert ist, welche eine frei wählbare Fluoreszenzanregung in einem Wellenlängenbereich mit einer Breite größer als 100 nm ermöglicht.
2. Testpräparat für Mikroskope nach Anspruch 1, wobei der Zellverband mit einer Verbindung fixiert ist, welche eine frei wählbare Fluoreszenzanregung in einem Wellenlängenbereich von 450 bis 650 nm ermöglicht.
3. Testpräparat für Mikroskope nach Anspruch 1, wobei der Zellverband mit einer Verbindung fixiert ist, welche eine frei wählbare Fluoreszenzanregung in einem Wellenlängenbereich von 350 bis 700 nm ermöglicht.
4. Testpräparat für Mikroskope nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Zellverband mit Glutardialdehyd fixiert ist.
5. Testpräparat für Mikroskope nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Verbindung ein Antifade-Reagens hinzugefügt ist.
6. Testpräparat für Mikroskope nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Zellverband eine dichte Struktur vorzugsweise über das gesamte Sehfeld des Mikroskops aufweist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein neuartiges Testpräparat für Mikroskope, insbesondere Fluoreszenzmikroskope, welches sich dadurch auszeichnet, dass eine spektrale Anregung in
5 einem frei wählbaren Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts erfolgen kann.